

# El paper del sistema CRISPR/Cas en la modulació de la virulència

El locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) junt amb seqüències associades gens *cas* i proteïnes Cas (CRISPR associated genes) formen el sistema immune adaptatiu CRISPR/Cas, el qual és present en la majoria de *Archaea* i més del 40% en bacteris. S'han classificat en tres tipus (I-III) i 11 subtipus (IA-F, IIA-C i IIIA-B), basats en la filogènia i el mecanisme molecular d'acció. Aquests sistemes poden actuar com a barrera de la transferència horitzontal de gens, fonamental per a l'evolució dels procarïotes. A més estudis recents han demostrat funcionalitats alternatives del sistema CRISPR/Cas, basat en la capacitat de controlar la transcripció endògena i regular importants fenotips bacterians com ara la patogenicitat. L'objectiu és veure com les diferents funcions d'aquest sistema pot afectar en la modulació de la virulència de certs bacteris patògens.

## BLOQUEJA L'ENTRADA D'ÀCIDS NUCLEICS

Existeixen tres etapes comuns en els diferents sistemes:

1. **Adaptació**; inserció dels espaiadors, seqüències derivades de l'invasor, entremig de les repeticions de DNA que es troben en el locus CRISPR
2. **Biogènesis** del RNA CRISPR (crRNA); repeticions i espaiadors es transcriuen en un únic precursor crRNA, que posteriorment és processat en petits crRNAs d'interferència, els quals contenen una sola seqüència espaiadora. Cada un dels crRNA madurs defineix una sola diana d'àcid nucleic
3. **Senyalització**; els crRNA madurs s'acoblen a les proteïnes Cas que dirigeixen la destrucció dels àcids nucleics invasors.

## BARRERA A LA TRANSFERÈNCIA HORITZONTAL DE GENS

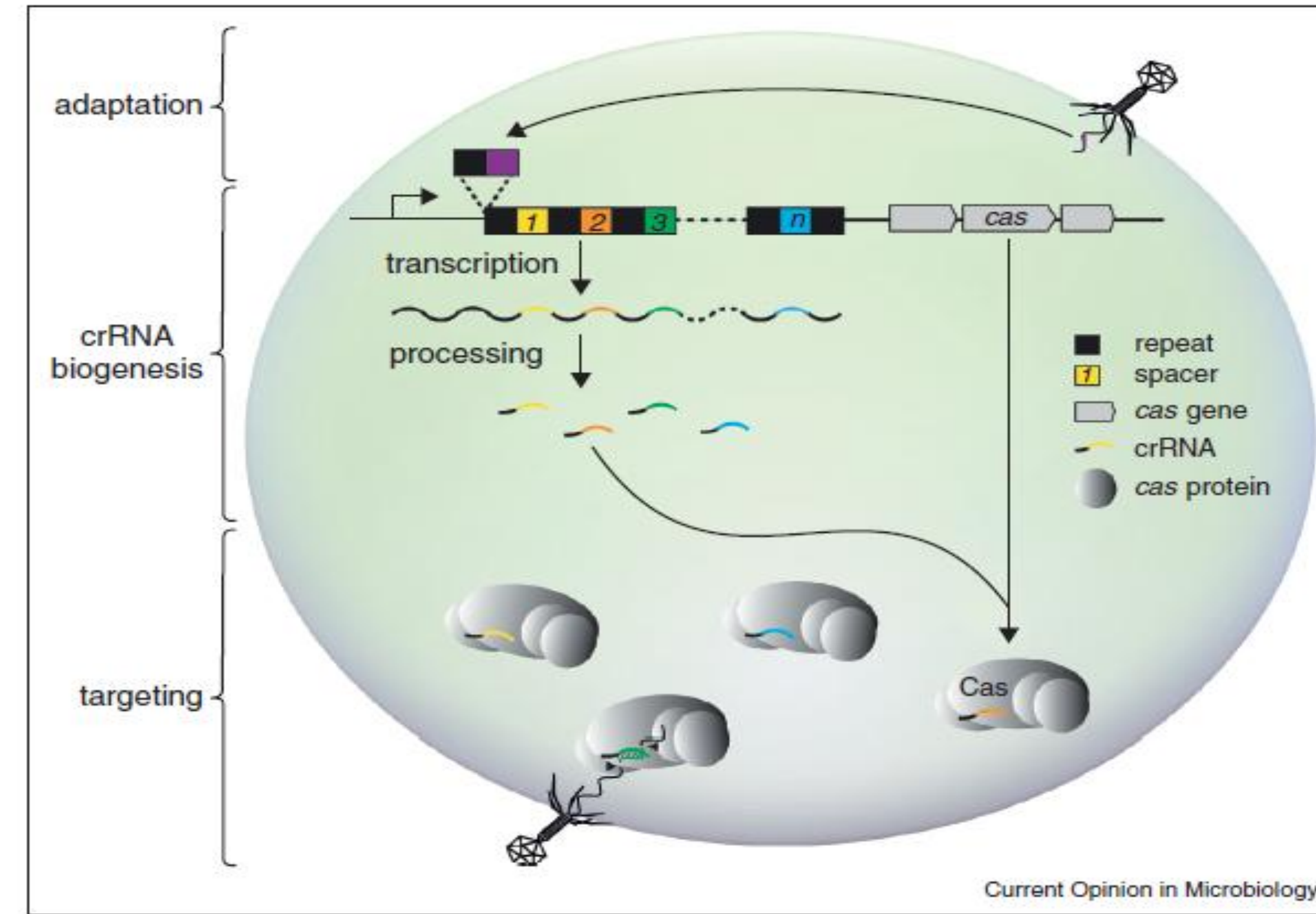


Figura 1. Bloqueig de l'entrada d'àcids nucleics (1)

### LIMITA LA CONJUGACIÓ

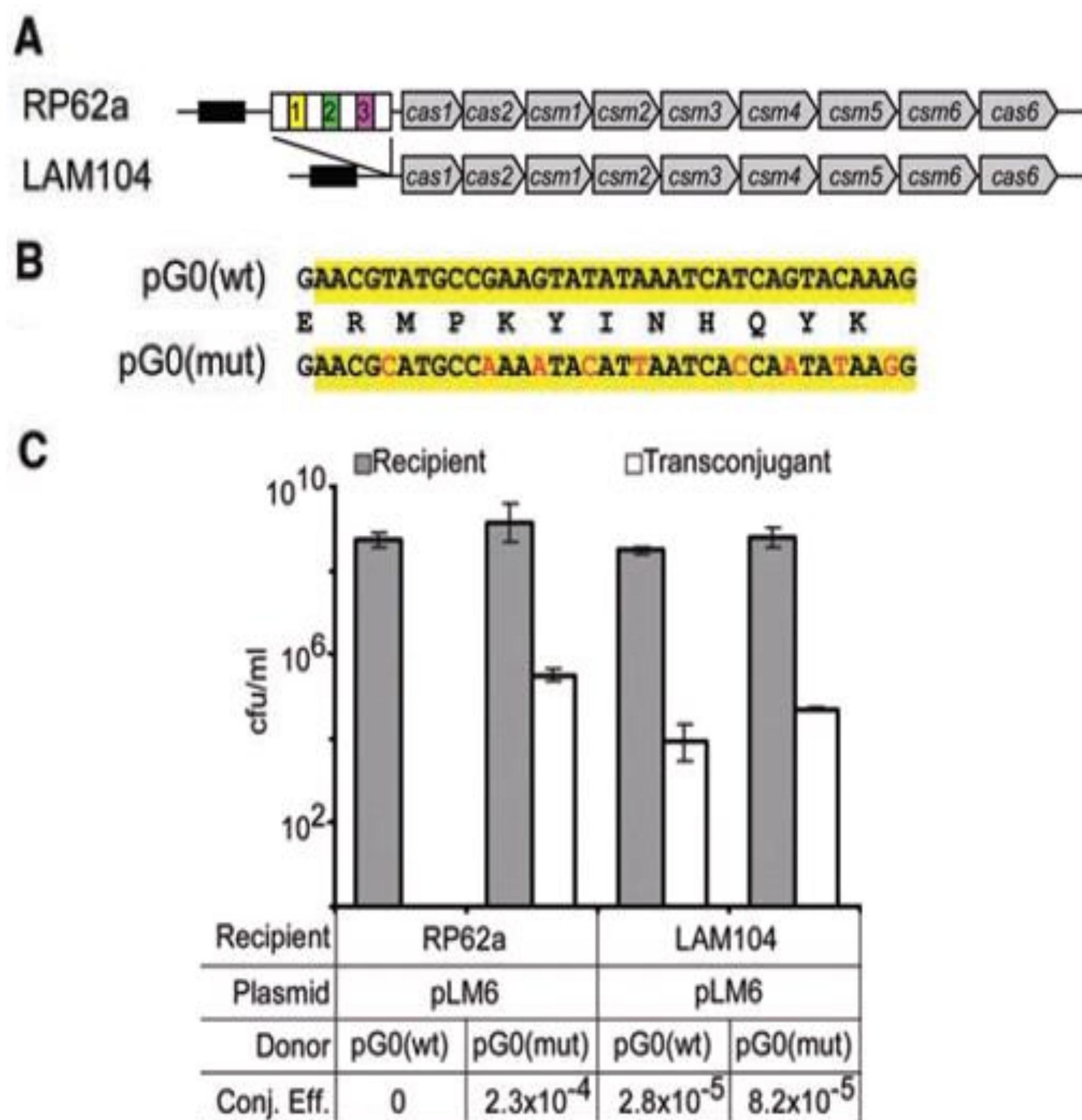


Figura 2. El sistema CRISPR proporciona immunitat contra la conjugació plasmídica en *S. epidermidis* (2)

### LIMITA LA TRANSFORMACIÓ

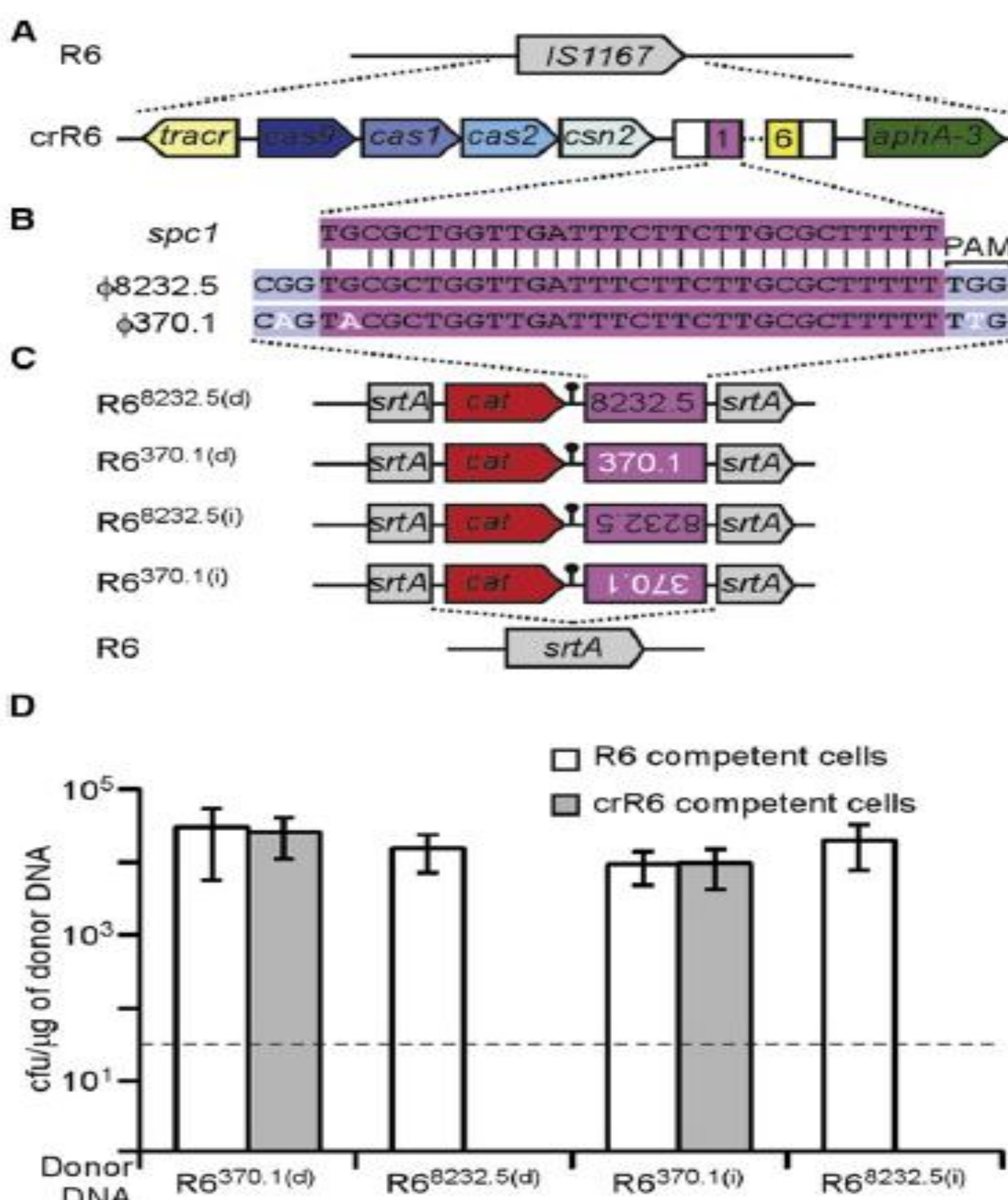


Figura 3. El sistema CRISPR limita la transformació natural en pneumococs competents (3)

### LIMITA LA TRANSDUCCIÓ

Taula 1. Característiques dels espaiadors en *S. pyogenes*. (4)

	CRISPR1	CRISPR2
Mida espaiador (bp)	30 (30-31)	35 (33-36)
Número d'espaiadors	23	33
Número d'espaiadors diferents	18	23
Número d'espaiadors únics	14 (78%)	13 (57%)
Número de diferents espaiadors que coincideixen amb el cromosoma	1	0
Número de diferents espaiadors que coincideixen amb profags	13	13
Número de diferents espaiadors que coincideixen amb profags propis	0	0

• La soca *Staphylococcus epidermidis* RP62a conté el locus CRISPR amb un espaiador (*spc1*) homòleg a la regió *nes* present en tots els plasmidis de conjugació d'estafilococs.

• Per determinar si *spc1* impedeix la conjugació plasmídica, es va interrompre la seqüència *nes* mitjançant la introducció de 9 mutacions en el plasmidi pG0400, generant pG0(mut).

• A part, es va deletar part del locus CRISPR de RP62a, generant així la soca LAM104 *Δcrispr*.

• RP62a i LAM104 es van sotmetre a la transferència del plasmidi conjugatiu pG0(wt) i pG0(mut).

• Els resultats van mostrar que la transferència del plasmidi només va ser efectiva en la soca LAM104.

• Així doncs, es va demostrar que el sistema CRISPR/Cas de *S. epidermidis* pot limitar la conjugació del plasmidi pG0400 de *S. aureus* en el laboratori.

• L'element IS1167 de *S. pneumoniae* R6 va ser substituït pel locus CRISPR01 de *S. pyogenes* SF370 per generar la soca de *S. pneumoniae* crR6.

• L'espaiador *spc1* coincideix amb els profags *S. pyogenes*  $\phi$ 8232.5 i  $\phi$ 370.1, contenint aquest últim desaparellament en la diana i en les regions flanquejants.

• Les soques donadores es van generar mitjançant la inserció de la seqüència diana ( $\phi$ 8232.5) o la seqüència control ( $\phi$ 370.1) en el locus *srtA* de *S. pneumoniae* R6, en ambdues direccions (d, directe; i, invertida). Per a la selecció dels transformants es va inserir també un casset de resistència a cloramfenicol (*cat*).

• Les cèl·lules competents R6 i crR6 es van incubar amb el DNA purificat de cada soca donadora, i els transformants resultants es van seleccionar mitjançant la resistència a cloramfenicol, mesurant així l'eficiència de transformació.

• Aquests resultats indiquen que la interferència de CRISPR pot impedir la transformació natural de bacteris competents.

• Per tal d'avaluar la funcionalitat de CRISPR en *Streptococcus pyogenes*, es van examinar, d'aquelles soques que contenen el sistema d'interferència, les seqüències espaiadores i es van definir les dianes respectives.

• De 41 espaiadors diferents, 26 coincidien amb profags d'estreptococs i un coincideix amb una seqüència cromosòmica pròpia.

• No existeix cap espaiador que sigui homòleg a una regió profag del seu propi genoma, és a dir hi ha una relació exclouent entre espaiadors i profags.

## PAPERS MÉS ENLLÀ DE LA IMMUNITAT

### CRISPR/Cas juga un paper crític en la patogènesis

• En *Francisella novicida*, els components del sistema senyalitzen un transcrit endogen que codifica per una lipoproteïna bacteriana immunoestimulant (BLP), conduint a la degradació del mRNA i evadint així la detecció mitjançant receptors de patrons moleculars de l'hoste (5).

• De la mateixa manera, CRISPR/Cas s'ha vist implicats en la capacitat de *Neisseria meningitidis* i *Campylobacter jejuni*, de unir-se, envair i replicar-se dins les cèl·lules epitelials, i en l'habilitat de *Legionella pneumophila* per a sobreviure dins les amebes (5).

### CRISPR/Cas pot controlar la fisiologia bacteriana

En *Pseudomonas aeruginosa* juga un paper en la modulació de la formació de biofilms. Quan *P. aeruginosa* és lisogenitzada per un bacteriòfag específic, el sistema CRISPR/Cas interacciona amb un gen en particular del profag integrat cromosòmicament per inhibir la formació de biofilms (6).

## CONCLUSIONS

- Per una banda, l'habilitat de prevenir la transferència de resistència a antibiòtics i gens de virulència pot reduir la capacitat evolutiva del patògen. I per l'altre, el sistema CRISPR/Cas pot ser proposat com a regulador de l'expressió gènica i millorar així la patogènesis.
- Determinar com els sistemes CRISPR/Cas contribueixen a la virulència bacteriana permetrà la identificació de noves estratègies d'evasió de defensa de l'hoste que els bacteris patògens utilitzen durant la infecció.
- Gràcies a les seves característiques sorgeixen noves perspectives i aplicacions en àrees industrials i biotecnològiques.

### Referències

- (1) Hatoum-Aslan A, Marraffini L. 2014. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology 17:82-90.
- (2) Marraffini L, Sontheimer E. 2008. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. Science 322:1843-1845.
- (3) Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, Marraffini L. 2012. CRISPR Interference Can Prevent Natural Transformation and Virulence Acquisition during In Vivo Bacterial Infection. Cell Host & Microbe 12:177-186.
- (4) Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, Watanabe T, Haobam B, Kurokawa K, Maruyama F, Nakagawa I. 2011. CRISPR Inhibition of Prophage Acquisition in Streptococcus pyogenes. PLoS ONE 6:e19543.
- (5) Barrangou R. 2015. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. Current Opinion in Immunology 32:36-41.
- (6) Sampson T, Weiss D. 2013. Alternative Roles for CRISPR/Cas Systems in Bacterial Pathogenesis. PLoS Pathogens 9:e1003621.